

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 54, No 4 (2003)



### Pharmacokinetics of chloramphenicol (CAP) in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and its in vitro activities against important bacterial fish pathogens

A. E. TYRPENOU (Α.Ε. ΤΥΡΠΕΝΟΥ), G. RIGOS (Γ. ΡΗΓΟΣ), M. YAGNISI (Μ. ΓΙΑΓΝΙΣΗ), I. NENGAS (Ι. ΝΕΓΚΑΣ), M. ALEXIS (Μ. ΑΛΕΞΗΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15340](https://doi.org/10.12681/jhvms.15340)

#### To cite this article:

TYRPENOU (Α.Ε. ΤΥΡΠΕΝΟΥ) A. E., RIGOS (Γ. ΡΗΓΟΣ) G., YAGNISI (Μ. ΓΙΑΓΝΙΣΗ) M., NENGAS (Ι. ΝΕΓΚΑΣ) I., & ALEXIS (Μ. ΑΛΕΞΗΣ) M. (2017). Pharmacokinetics of chloramphenicol (CAP) in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and its in vitro activities against important bacterial fish pathogens. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 54(4), 311–320. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15340>

## Φαρμακοκινητική μελέτη της χλωραμφενικόλης (CAP) στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) και *in vitro* δράση κατά σημαντικών για τα ψάρια παθογόνων βακτηρίων

A. E. Τυρπένου,<sup>1\*</sup> Γ. Ρήγος,<sup>2</sup> Μ. Γιαγνίσι,<sup>2</sup>  
Ι. Νέγκας,<sup>2</sup> Μ. Αλέξη<sup>2</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκαν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες της χλωραμφενικόλης (CAP) στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) και η *in vitro* αποτελεσματικότητά της κατά των διαφόρων βακτηριακών ασθενειών. Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση της CAP στη δόση των 10 mg/kg/ψάρι, ο χρόνος ημίσειας ζωής της CAP κατανομής ( $t_{1/2\alpha}$ ) και ο χρόνος ημίσειας ζωής της απομάκρυνσης ( $t_{1/2\beta}$ ) βρέθηκαν ότι είναι 1.6 και 69 h, αντίστοιχα. Η διάχυση της CAP στους ιστούς της τσιπούρας ήταν μέτρια εφόσον αμφότεροι, τόσο ο φαινομενικός όγκος κατανομής ( $V_{d(ss)}$ ) όσο και ο φαινομενικός όγκος του κεντρικού διαμερίσματος ( $V_c$ ), υπολογίσθηκαν σε 1,13 και 0,90 L/kg. Η ολική σωματική απομάκρυνση ( $CL_T$ ) της CAP ήταν βραδεία (0,022 L/kg/h). Οι τιμές MIC της CAP σε απεσταγμένο νερό με προσθήκη 2% NaCl κατά των *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1b, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *V. alginolyticus* και *V. fluvialis* υπολογίσθηκε σε 4,78 µg/mL, ενώ ήταν 0,60 µg/mL για το *V. damsela*. Η προσθήκη στο υπόστρωμα 10 mM  $Ca^{2+}$  και 55 mM  $Mg^{2+}$  έδωσε τιμές MIC 19,13 µg/mL για το *V. alginolyticus* και το *V. fluvialis*, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποιο αποτέλεσμα με το *V. anguillarum* *P. damsela* subsp. *Piscicida* και το *V. damsela*. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η CAP παρουσιάζει μια ικανοποιητική εικόνα κινητικής και ότι απομακρύνεται γρήγορα από τη σάρκα της τσιπούρας, ενώ οι υψηλές τιμές MIC δείχνουν μια πιθανή αναποτελεσματικότητα ενάντια σημαντικών παθογόνων βακτηρίων στα ψάρια της Μεσογείου.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** φαρμακοκινητική, χλωραμφενικόλη, MIC, τσιπούρα

## Pharmacokinetics of chloramphenicol (CAP) in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and its *in vitro* activities against important bacterial fish pathogens

Tyrpenou A.E.,<sup>1,\*</sup> Rigos G.,<sup>2</sup> Yiagnisi M.,<sup>2</sup>  
Nengas I.,<sup>2</sup> Alexis M.<sup>2</sup>

**ABSTRACT.** The pharmacokinetics of chloramphenicol (CAP) in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), a warm water farmed fish species and its *in vitro* efficacy against important bacterial diseases of Mediterranean mariculture were investigated in this study. After an intravascular injection (10 mg/kg/fish), the distribution half-life ( $t_{1/2\alpha}$ ) and the elimination half-life ( $t_{1/2\beta}$ ) of CAP were calculated to be 1.6 and 69 h, respectively. Tissue penetration of CAP was found to be moderate since both the apparent volume of distribution of the drug at steady-state ( $V_{d(ss)}$ ) and the apparent volume of the central compartment ( $V_c$ ) were calculated to be 1.13 and 0.90 L/kg. The total clearance ( $CL_T$ ) of the drug was slow (0.022 L/kg/h). The minimum inhibitory concentration (MIC) values of CAP in distilled water supplemented with 2% NaCl against *Vibrio anguillarum* serotype 1b, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *V. alginolyticus* and *V. fluvialis* were determined to be 4.78 µg/mL, while it was 0.60 µg/mL for *V. damsela*. The addition of 10 mM  $Ca^{2+}$  and 55 mM  $Mg^{2+}$  in the medium revealed MIC values of 19.13 µg/mL for *V. alginolyticus* and *V. fluvialis*, whereas showed no effect for *V. anguillarum* *P. damsela* subsp. *Piscicida* and *V. damsela*. The results indicate that CAP displayed a satisfactory kinetic profile and it is eliminated fast from gilthead sea bream muscle; however, its high MIC values stress show a possible inefficacy against important bacterial pathogens of Mediterranean mariculture.

**Key words:** pharmacokinetics, chloramphenicol, MIC, seabream

<sup>1</sup> Τομέας Μελέτης Καταλοίπων, Εργαστήριο Υγιούς Χρωματογραφίας, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Αθηνών, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Νεαπόλεως 25, Αγία Παρασκευή 153 10, Αθήνα

<sup>2</sup> Εργαστήριο Διατροφής και Παθολογίας Αλιευμάτων, Εθνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Αγίος Κοσμάς 166 04, Ελληνικό, Αττική

<sup>1</sup> Department of Residue Research, HPLC Laboratory, Institute of Veterinary Research of Athens, National Agricultural Research Foundation, 25 Neapoleos Street, Agia Paraskevi 153 10, Athens, Greece

<sup>2</sup> Laboratory of Fish Nutrition and Pathology, National Centre for Marine Research, Aghios Kosmas 166 04, Ellinikon, Attiki, Greece

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χλωραμφενικόλη (CAP) είναι ένα συνθετικά παρασκευαζόμενο αντιβιοτικό ευρέως φάσματος, το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά από το *Streptomyces venezuelae* την περίοδο του 1950. Είναι δραστική κατά των διαφόρων παθογόνων gram-αρνητικών βακτηρίων των παραγωγικών ζώων, συνδεόμενη στην υποομάδα 50S του βακτηριακού ριβοσώματος. Στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκε εκτενέστατα κατά διαφόρων ασθενειών του ανθρώπου και των ζώων, αλλά λόγω πρόκλησης της απλαστικής αναιμίας (IARC, 1990), καθώς και άλλων δυσκρασιών του αίματος, το FDA/USA απαγόρευσε πλήρως τη χρησιμοποίηση της CAP στα παραγωγικά ζώα (MVM, 1998). Σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Γραφείο Αξιολόγησης Φαρμακευτικών Προϊόντων (EMA) η χρήση της απαγορεύεται και στην Ευρώπη, αλλά επειδή δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για τον καθορισμό της Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης (ADI) και του Μεγίστου Ορίου Καταλοίπων (MRL), έχει συμπεριληφθεί στο Παράρτημα IV του Κανονισμού του Συμβουλίου (ΕΟΚ) 2377/90.

Λόγω της δραστικότητάς της κατά των παθογόνων βακτηρίων είναι συνηθισμένη η παράνομη χρήση της (Robert et al. 1996). Τα επιστημονικά δεδομένα των φαρμακοκινητικών της ιδιοτήτων σε εκτρεφόμενους στο νερό οργανισμούς αφορούν κυρίως σε ψάρια του γλυκού νερού (Skare et al. 1974, Cravedi et al. 1985) και καραβίδες (Liu and Liu, 1993), ενώ πρόσφατα δημοσιεύθηκαν οι τιμές MIC της CAP κατά των παθογόνων βακτηρίων στα χένια (*Pecten maximus*) (Torkildsen et al. 2000).

Η παρούσα μελέτη είχε σκοπό τον εμπλουτισμό των πληροφοριών πάνω στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της CAP στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) και τον υπολογισμό των τιμών MIC κατά των κυριότερων παθογόνων βακτηρίων, τα οποία επηρεάζουν τη βιομηχανική αυτή δραστηριότητα. Επιπλέον, στην εργασία αυτή συμπεριλαμβάνεται και η έρευνα για τη διαπίστωση της επίδρασης των κατιόντων του θαλασσινού νερού στην αντιμικροβιακή της δράση.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Χημικά αντιδραστήρια

Η προμήθεια της CAP έγινε από την εταιρεία Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Τα χημικά αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη χημική ανάλυση των δειγμάτων καθαρότητας HPLC ήταν της εταιρείας Labscan Ltd (Dublin, Ireland). Για την αναισθητοποίηση των ψαριών χρησιμοποιήθηκε η κουϊναλδίνη, η οποία επίσης αγοράσθηκε από τη Sigma Chemical Co, St. Louis, USA.

### Πειραματικός σχεδιασμός

Χρησιμοποιήθηκαν 50 τσιπούρες μέσου βάρους  $300 \pm 30$  g, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε κυλινδρoκωνικές δεξαμενές χωρητικότητας 800 L με θαλασσινό νερό αλατότητας 36‰. Πριν από την έναρξη του πειραματισμού τα ψάρια παρέμειναν για μια περίοδο εγκλιματισμού δύο ε-

## INTRODUCTION

Chloramphenicol (CAP) is a broad-spectrum bacteriostatic antibiotic first isolated from *Streptomyces venezuelae* in the 50s and now available synthetically. The drug is active against several pathogenic gram-negative bacteria occurring in a number of food producing animals by binding to the 50s subunit of the bacterial ribosome. CAP has been used widely in the past against human and veterinary bacterial infections, however, its major flaw, the production of aplastic anemia (IARC, 1990) and other blood dyscrasias the FDA/USA has banned CAP use from food producing animals (MVM, 1998). According to the EMA in Europe, CAP is also forbidden and since no adequate data is available to establish an acceptable daily intake (ADI) and maximum residue limit (MRL), the drug is included in Annex IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90. Due to its effectiveness against bacterial pathogens, its illegal use is common (Robert et al. 1996). Limited information exists on the kinetics of CAP in farmed aquatic organisms mainly confined to fresh water fish (Skare et al. 1974, Cravedi et al. 1985) and prawns (Liu and Liu, 1993). Some data on the minimum inhibitory concentrations (MIC) of CAP against bacteria pathogens of scallop (*Pecten maximus*) were recently published (Torkildsen et al. 2000).

The aim of the present study was to provide information on the pharmacokinetic properties of CAP in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), which is the leading warm water farmed species in Mediterranean area and to determine MIC values against the most important bacterial pathogens affecting this industry, including an investigation of the effect of seawater cations to the antimicrobial activity of CAP.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

CAP was obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). The chemicals used for processing the samples (HPLC-grade) were obtained from Labscan Ltd (Dublin, Ireland), unless otherwise stated. Fishes were anaesthetized with quinaldine (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA).

### Experimental design

Fifty gilthead sea bream averaging  $300 \pm 30$  g were acclimatized for two weeks prior to initiation of the study. Fishes were maintained in cylindroconical fiberglass tanks (800 L) receiving 36‰ sea water. Photoperiod was kept at 12 h dark - 12 h light and water temperature was  $19 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Fishes were starved for two days before the experiment and remained unfed during the experiment.

### Drug administration

Prior to injection fishes were anaesthetized with quinaldine (2 ml/L) dissolved in salt water and were weighed. Fishes received 100  $\mu\text{L}$  of medicated solution including the dose (10 mg/kg fish) in sterile saline. To ensure the correct position of the needle (caudal vein)

βδομάδων με φωτοπερίοδο η οποία διατηρήθηκε σε 12 h σκοτάδι και 12 h φως και με μέση θερμοκρασία του νερού  $19 \pm 0,5^\circ \text{C}$ . Πριν από την έναρξη του πειράματος τα ψάρια παρέμειναν νηστικά για δύο μέρες και χωρίς τροφή κατά τη διάρκεια του πειραματισμού.

### Χορήγηση του φαρμάκου

Πριν από την ενδοφλέβια χορήγηση της CAP τα ψάρια αναισθητοποιούνταν με τη χορήγηση της κουϊναλδίνης (2 ml/L θαλασσινού νερού) και ζυγίζονταν. Στη συνέχεια εγχέονταν ενδοφλέβια 100  $\mu\text{L}$  από το φαρμακικό διάλυμα σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό στη δόση των 10 mg/kg βιομάζας. Για να βεβαιωθεί για την ακριβή θέση της βελόνας στην ουραία φλέβα (Microlance 23G  $1_{1/4}$  0.6 x 30, Becton Dickinson SA, Fraga, Spain), πριν και μετά από την έγχυση γινόταν αναρρόφηση αίματος. Τα ψάρια, τα οποία παρουσίαζαν έντονη αιμορραγία, αποκλείονταν από τον πειραματισμό και αντικαθίσταντο από άλλα. Μετά από την ενδοφλέβια χορήγηση του φαρμάκου λαμβανόταν δείγμα αίματος 1 mL από την ουραία φλέβα κάθε ψαριού από τα 8 ψάρια κάθε δείγματος ανά χρονική στιγμή δειγματοληψίας, δηλαδή ανά 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 και 128 h. Μετά τη συλλογή των δειγμάτων αίματος τα ψάρια θανατώνονταν με κόψιμο της νωτιαίας χορδής και 2 g σάρκας χωρίς δέρμα και αίμα λαμβάνονταν από προκαθορισμένο σημείο του σώματος (νωτιαία περιοχή μόλις πάνω από την πλάγια γραμμή). Το πλάσμα του αίματος παραλαμβάνονταν με φυγοκέντρηση σε 3000 x g για 10 min στους  $4^\circ \text{C}$ . Στη συνέχεια τα δείγματα της σάρκας και του πλάσματος του αίματος συντηρούνταν στους  $-45^\circ \text{C}$  μέχρι την ανάλυση.

### Υγροχρωματογραφική ανάλυση

Η μέθοδος η οποία εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της CAP στα δείγματα της σάρκας ήταν των Tyrpenou et al (2002) και για το πλάσμα του αίματος χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος με μικρές τροποποιήσεις. Συνοπτικά, 0,2 mL πλάσμα αίματος εκχυλιζόταν με 2 x 2 mL οξικού αιθυλεστέρα με ανάδευση στο vortex και σε υπέρηχους, φυγοκεντρώνταν σε 3500 x g για 10 min στους  $10^\circ \text{C}$  και το υπερπλέον εκχύλισμα μεταφερόταν σε άλλο γυάλινο φιαλίδιο. Τα δύο εκχυλίσματα εξατμίζονταν σε ρεύμα αζώτου στους  $55^\circ \text{C}$  και το ελαϊώδες υπόλειμμα διαλύετο σε 1 mL διαλύματος 3% NaCl με ανάδευση στο vortex και στους υπέρηχους. Ακολουθούσε ένα στάδιο κατανομής με 3 mL n-πεντάνιο και μετά από φυγοκέντρηση η πάνω στιβάδα απορριπτόταν με αναρρόφηση. Το δείγμα εκχυλιζόταν και πάλι με 2 x 2 mL οξικού αιθυλεστέρα και τα εκχυλίσματα εξατμίζονταν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου στους  $55^\circ \text{C}$ . Το φιαλίδιο ξεπλενόταν με 1 mL n-εξάνιο, το οποίο μεταφερόταν στη μικροστήλη SPE (Sep-Pak Light Silica Cartridges, Waters MA, USA). Η μικροστήλη ξεπλενόταν με 2 mL n-εξανίου για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών και η εκλεκτική αποδέσμευση της CAP από τη silica gel γινόταν με 1 mL μεθυλικής αλκοόλης HPLC. Το έκλουσμα εξατμίζόταν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου στους  $55^\circ \text{C}$  και το υπόλειμμα αναδιαλύετο σε 0,5 mL κινητής φά-

(Microlance 23G  $1_{1/4}$  0.6 x 30, Becton Dickinson SA, Fraga, Spain) in the caudal vein blood was aspirated into the syringe prior and following injection. Fishes which were bled heavily, were excluded and replaced. Approximately 1 mL of blood was drawn from the caudal vein of several fishes (6-8 individuals), at each of the time points following dosing (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 h). After collecting blood samples, fishes were killed by a blow to the head and 2 g of muscle, devoid of skin or blood, was taken from the dorsal area just above the lateral line. Plasma was prepared from blood samples by centrifugation at 3000 x g for 10 min at  $4^\circ \text{C}$ . Muscle and plasma samples were stored at  $-20^\circ \text{C}$  until analysis.

### Drug Analysis

The methodology for the analysis of CAP in muscle samples followed that of Tyrpenou et al. (2002). For analysis of CAP in plasma, minor modifications were made. Briefly, 0.2 mL plasma were extracted with 2 mL ethyl acetate by vortex mixer and sonication, centrifuged at 3500 x g for 10 min at  $10^\circ \text{C}$  and the supernatant was transferred to another glass vial. The sample was extracted once more with 2 mL ethyl acetate and the combined extracts were then evaporated under a gentle stream of nitrogen at  $55^\circ \text{C}$ . The remaining oily residue was dissolved in 1 mL of 3% NaCl by vortex and sonication. A partition washing step with 3 mL n-pentane was followed and after centrifugation the upper layer was rejected by aspiration. CAP was back extracted with 2 x 2 mL ethyl acetate and the combined extracts were evaporated to dryness with nitrogen at  $55^\circ \text{C}$ . The vial was rinsed with 1 mL n-hexane and rinsing was poured into the mini column (Sep-Pak Light Silica Cartridges, Waters MA, USA). Rinsing of the mini column for the removal of the undesired matrix compounds was made with 2 mL n-hexane and selective desorbing of CAP from silica gel was made with 1 mL of HPLC methanol. The eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at  $55^\circ \text{C}$  and the residue was redissolved in 0.5 mL of the mobile phase (methanol: HPLC-grade water, 30:70 v/v), filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  filter into 1 mL the autosampler's glass vial. An aliquot of 100  $\mu\text{L}$  was immediately injected into a Photo Diode Array detector (Waters MA, USA) monitored at  $\lambda 1 \sim 278 \text{ nm}$ . Analytes were separated using a Zorbax SB-C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ ) column (25 cm x 4.6 mm i.d.) (Waters MA, USA) maintained at a temperature of  $50^\circ \text{C}$ . Mean recovery achieved was  $88.62 \pm 9.65 \%$  for a range of 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/kg}$  blank fortified samples ( $n = 4$ ). The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 5 and 10  $\mu\text{g/kg}$ , respectively. Control of the system, data acquisition and peak integration were performed by the software Millennium<sup>32</sup> Workstation plus Millennium<sup>32</sup> System Suitability software Version 3.05.01. CAP concentrations were extrapolated from the standard curves.

### Pharmacokinetic analysis

The data were analyzed for the best fit to a two or three-compartment open pharmacokinetic model, using non-

σης (μεθυλική αλκοόλη:νερό 30:70 v/v) και διηθούνται από φίλτρο 0,22  $\mu\text{m}$  σε γυάλινο φιαλίδιο του αυτόματου δειγματολήπτη του 1 mL. Όγκος 100  $\mu\text{L}$  αμέσως εγχέεται στον υδροχρωματογράφο για ανίχνευση της CAP από τον ανιχνευτή πολλαπλών φωτοδίοδων - PDA (Waters MA, USA) στο  $\lambda_{\text{max}} \sim 278 \text{ nm}$ . Η χρωματογραφική ανάλυση γινόταν σε στήλη Zorbax SB-C18, 5  $\mu\text{m}$ , 25 cm x 4.6 mm i.d. (Waters MA, USA) σε θερμοκρασία στήλης 50°C. Η μέση ανάκτηση ήταν  $88.62 \pm 9.65\%$  για ένα εύρος από 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/kg}$  αρνητικών επιβαρυνμένων δειγμάτων ( $n = 4$ ). Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) ήταν 5 και 10  $\mu\text{g/kg}$ , αντίστοιχα. Ο έλεγχος του αναλυτικού συστήματος, η συλλογή των δεδομένων και η ολοκλήρωση των κορυφών γίνονταν με το λογισμικό Millennium<sup>32</sup> Workstation plus Millennium<sup>32</sup> System Suitability software Version 3.05.01.

### Φαρμακοκινητική ανάλυση

Για καλύτερο αποτέλεσμα τα δεδομένα των μετρήσεων υπέστησαν επεξεργασία με φαρμακοκινητικό μοντέλο δύο ή τριών διαμερισμάτων και με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος μη-γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης (NLREG, 2001), ακολουθώντας ημιλογαριθμική ανάπτυξη των μετρήσεων και ανάλυση ελάχιστων τετραγώνων (Ritschel, 1986). Ο υπολογισμός του φαινομενικού όγκου κατανομής, του μέσου χρόνου παραμονής (MRT) και της ολικής σωματικής απομάκρυνσης (CLT) έγιναν με τρόπο ανεξάρτητο των μοντέλων. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου (AUC) υπολογίστηκε με τον κανόνα του τραπεζοειδούς (Ritschel, 1986). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της απομάκρυνσης υπολογίστηκε από την εξίσωση  $t_{1/2} = \ln 2 / \beta$  (Baggot, 1977).

### Προσδιορισμός των τιμών MIC

Οι δοκιμές MIC έγιναν με τη μέθοδο της μικροαραίωσης του υγρού (broth microdilution method) στους 22°C. Το διάλυμα της CAP έγινε σε δισαπτεσταγμένο νερό. Οι αραιώσεις έγιναν σε ζωμό Muller Hinton broth, ο οποίος είχε παρασκευασθεί είτε σε δισαπτεσταγμένο νερό με 2% NaCl είτε με την επιπλέον προσθήκη 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  και 55 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (συγκεντρώσεις οι οποίες προσεγγίζουν την αλατότητα της Μεσογείου), μιας και προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την επίδραση αυτών των κατιόντων στη δραστηριότητα των φαρμάκων στο θαλάσσιο περιβάλλον (Barnes et al. 1995, Pursel et al. 1995, Lunestad and Samuelsen, 2001). Οι συγκεντρώσεις της CAP στα πηγάδια της δοκιμής κυμαίνονταν από 0,019 έως 38,25  $\mu\text{g/ml}$ .

Όλα τα παθογόνα βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή, προήρχοντο από ασθενή εκτρεφόμενα ψάρια, τσιπούρες και λαβράκια, από το 2000 ως το 2001 και λήφθηκαν από το αρχείο του εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας του Εθνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΚΘΕ), όπου συντηρούνται στους -70°C σε γλυκερίνη 20%. Τα βακτήρια αυτά προκαλούν τις πλέον σημαντικές απώλειες στην ευρύαλη θαλασσοκαλλιέργεια και περιλαμβάνουν τα πρωτογενή παθογόνα *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1b, *Photobacterium damsela* subsp.

linear regression analysis programs (NLREG 2001, P.H. Sherrod), following a semi-logarithmic plot of the data and least square fitting (Ritschel, 1986). Diffusion processes were all assumed to follow first order kinetics. Calculations of the apparent volume of distribution at steady state ( $V_{\text{dss}}$ ), the mean residence time (MRT) and the total body clearance ( $\text{CL}_T$ ) were performed in a model independent way. The area under the concentration-time curve (AUC) was calculated using the trapezoidal rule (Ritschel, 1986). The elimination half-life were calculated from the equation  $t_{1/2} = \ln 2 / \beta$  (Baggot, 1977).

### MIC determinations

MICs were carried out with the broth microdilution method at 22°C. Antibiotic solution was made by dissolving CAP in distilled water. Dilutions were made in Muller Hinton broth (MHB) dissolved in either distilled water supplemented with 2% NaCl or additionally including 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 55 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (which approximates the content of the Mediterranean salinity), since previous studies have stressed the impact of these cations on the activity of drugs in marine environment (Barnes et al. 1995, Pursell et al. 1995, Lunestad and Samuelsen, 2001). CAP concentrations in the test wells ranged from 0.019 to 38.25  $\mu\text{g/ml}$ .

All bacterial pathogens which have been used in this study were derived from diseased farmed gilthead sea bream and sea bass from 2000 to 2001 and were received from the Fish Pathology Laboratory of the National Centre Marine Research (NCMR), where they were kept at -70°C in 20% glycerin. The bacteria inflict the most significant losses in euryhaline mariculture and include the primary pathogens *Vibrio anguillarum* serotype 1b, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *V. damsela* and the opportunistic bacteria *V. alginolyticus* and *V. fluvialis*. Only one representative strain of each bacterial pathogen in Greece was tested. The *Vibrio* species and *P. damsela* subsp. *piscicida* were identified according to Mercedes and Blanch (1994) and Bakopoulos et al. (1995), respectively. Bacterial aliquots were taken from glycerol stocks and maintained on Tryptic Soya Agar (TSA) supplemented with 2% NaCl. Single colonies were obtained from pure cultures (third passage on TSA), transferred to 10 mL Tryptic Soya broth (TSB) and incubated aerobically for 24 - 48 h at 22°C giving a final cell density of approximately  $10^6 \text{ cfu/mL}$ , before being transferred to microtiter tray wells (the optical density of the bacterial suspension was 0.2 at 480 nm). Sterile tissue culture plate (96-well flat bottom) with lid was used. In each well were added 50  $\mu\text{L}$  MHB, 50  $\mu\text{L}$  antibiotic solution and 10  $\mu\text{L}$  of each bacterial culture ( $10^4 \text{ cells/mL}$ ) by a multipoint pipette (Eppendorf, Germany). Plates were incubated for 48 h at 22°C. Each MIC value was defined as the lowest drug concentration which inhibited bacterial growth with the use of microplate reader (ASYS Hitech, Austria). MIC testing was performed in triplicate. Individual MICs are the means of replicate results performed twice within a week period.

*piscicida*, *V. damsela* και τα ευκαιριακά βακτήρια *V. alginolyticus* και *V. fluvialis*. Από κάθε παθογόνο βακτήριο εξετάστηκε ένα μόνο στέλεχος το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό στην Ελλάδα. Τα είδη *Vibrio* και *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια των Mercedes and Blanch (1994) και Bakopoulos et al (1995), αντίστοιχα. Τα βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, λήφθηκαν από τα διατηρημένα στη γλυκερίνη στέλεχη και καλλιιεργήθηκαν σε ζωμό Tryptic Soya Agar (TSA) με 2% NaCl. Χρησιμοποιήθηκαν μονές αποικίες από καθαρές καλλιέργειες (τρίτο πέραςμα σε TSA), οι οποίες μεταφέρθηκαν σε 10 ml ζωμό Tryptic Soya (TSB) και επωάστηκαν αερόβια για 24 - 48 ώρες στους 22°C, δίδοντας μια τελική πυκνότητα βακτηρίων 106 cfu/mL πριν από τη μεταφορά τους στα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης (η οπτική πυκνότητα του εναιωρήματος των βακτηρίων ήταν 0,2 στα 480 nm). Χρησιμοποιήθηκαν στείρες πλάκες (με 96 πηγαδάκια επίπεδης βάσης) με κάλυμμα. Σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν 50 μl MHB, 50 μl διαλύματος αντιβιοτικού και 10 μl από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια (10<sup>4</sup> cfu/mL) με μια πολυκανάλη πιπέτα (Eppendorf, Γερμανίας). Οι πλάκες επωάστηκαν για 48 ώρες στους 22°C. Κάθε τιμή MIC καθορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση φαρμάκου η οποία εμποδίζει τη βακτηριακή ανάπτυξη και μετρήθηκε με τη χρήση φωτόμετρου μικροπλάκων (ASYS Hiteck, Austria). Οι δοκιμές MIC έγιναν εις τριπλούν και οι τιμές MIC προέκυψαν από τους μέσους όρους των αποτελεσμάτων των δοκιμών, οι οποίες έγιναν δύο φορές σε περίοδο μιας εβδομάδας.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα συμφώνησαν εξίσου με τα δύο μοντέλα των δύο και τριών διαμερισμάτων. Επειδή το μοντέλο των τριών διαμερισμάτων έδωσε  $\alpha = \beta$ , η συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος προς την καμπύλη χρόνου υπολογίστηκε (κατά προτίμηση) από τη διεκθετική εξίσωση:  $C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ , όπου C η συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος, t είναι ο χρόνος,  $\alpha$  και  $\beta$  είναι οι κλίσεις των μονοεκθετικών καμπυλών και A και B είναι οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα του αίματος στο χρόνο μηδέν. Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι της CAP στην τσιπούρα, οι οποίες υπολογίστηκαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση ο χρόνος ημίσειας ζωής της κατανομής ( $t_{1/2\alpha}$ ) και ο χρόνος ημίσειας ζωής της απομάκρυνσης ( $t_{1/2\beta}$ ) της CAP από το πλάσμα του αίματος βρέθηκαν να είναι 1,6 και 69 h, αντίστοιχα. Ο φαινομενικός όγκος κατανομής ( $V_{d(ss)}$ ) και ο φαινομενικός όγκος του κεντρικού διαμερισματος ( $V_c$ ) υπολογίστηκαν σε 1,13 και 0,90 L/kg, αντίστοιχα. Η ολική σωματική απομάκρυνση ( $CL_T$ ) ήταν 0,022 L/kg/h και ο μέσος χρόνος παραμονής (MRT) ήταν 51 h. Τα επίπεδα της CAP που βρέθηκαν στο πλάσμα του αίματος και το μυϊκό ιστό φαίνονται στον Πίνακα 2. Υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στο μυϊκό ιστό 2 h μετά την έγχυση, με επίπεδα τα οποία παρουσίασαν πτώση στα επόμενα δείγματα. Η CAP δεν ανιχνεύθη-

**Πίνακας 1.** Συγκεντρώσεις της CAP στο πλάσμα του αίματος (μg/mL) και στο μυϊκό ιστό (μg/g) (mean  $\pm$  SD, n = 3-5) μετά από μία ενδοφλέβια έγχυση (10 mg/kg/ fish) στην τσιπούρα στους 19°C.

**Table 1.** Blood plasma (μg/mL) and muscle tissue (μg/g) concentration of CAP (mean  $\pm$  SD, n = 3-5) following a single intravascular injection (10 mg/kg/ fish) in gilthead sea bream held at 19°C.

Χρονικές στιγμές (ώρες μετά τη χορήγηση) Time points (hours post administration)	Πλάσμα αίματος Blood Plasma	Μυϊκός ιστός Muscle tissue
1	7.26 $\pm$ 1.37	2.18 $\pm$ 0.43
2	5.98 $\pm$ 2.26	2.46 $\pm$ 1.00
4	2.10 $\pm$ 1.08	1.99 $\pm$ 1.18
8	1.09 $\pm$ 0.68	1.24 $\pm$ 0.62
16	0.85 $\pm$ 0.18	0.15 $\pm$ 0.04
32	0.60 $\pm$ 0.37	0.08 $\pm$ 0.01
64	0.31 $\pm$ 0.08	ND
128	0.23 $\pm$ 0.19	ND

ND : δεν ανιχνεύθηκε

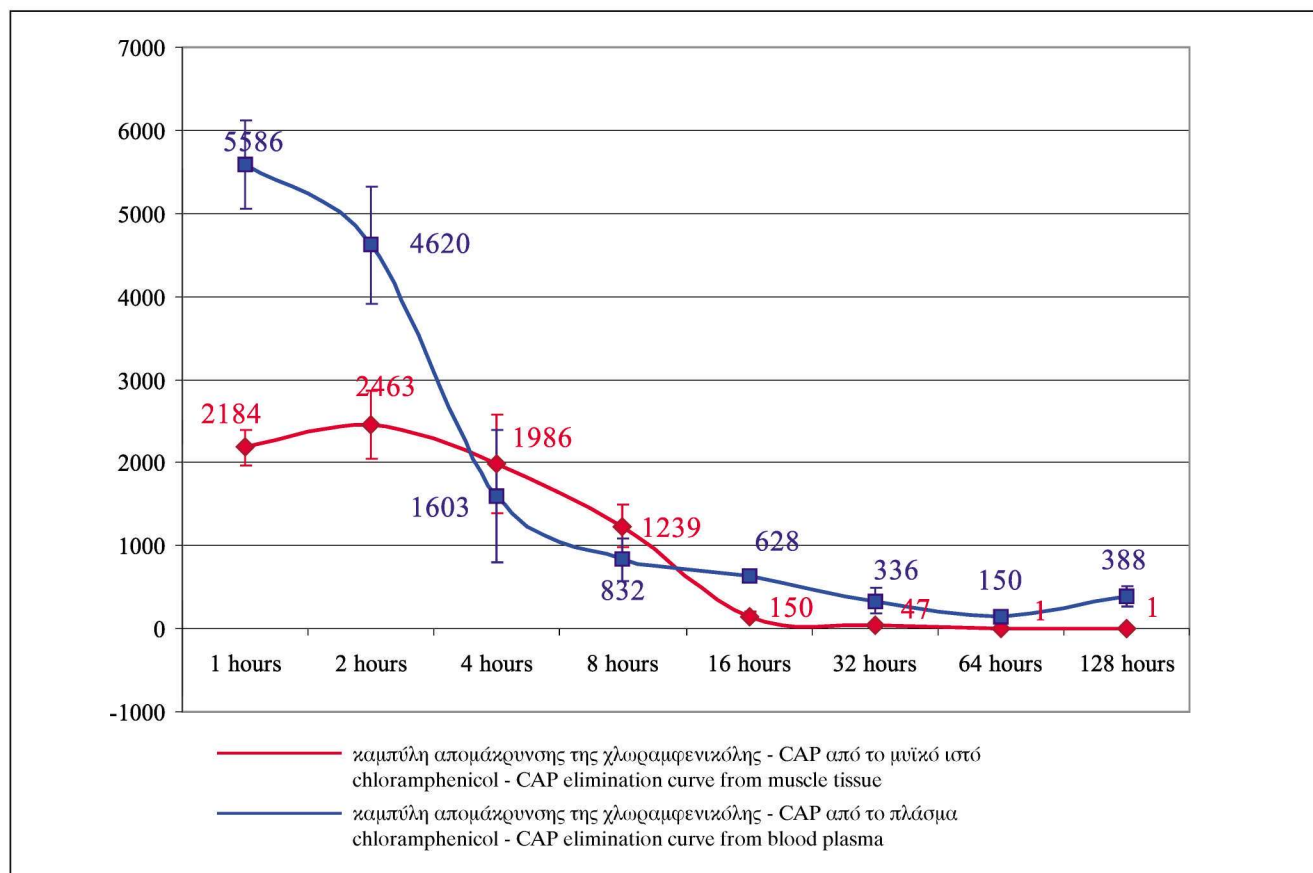
ND : not detected

**Πίνακας 2.** Παράμετροι φαρμακοκινητικής οι οποίες υπολογίστηκαν από την ενδοφλέβια χορήγηση της CAP (10 mg/kg/ fish) στην τσιπούρα (170 g) στους 19°C.

**Table 2.** Calculated pharmacokinetic parameters after intravascular injection of CAP (10 mg/kg/fish) in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (170 g) at 19°C.

Παράμετροι Parameter	Τιμή Value
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.65
$t_{1/2\beta}$ (h)	69.30
$V_{d(ss)}$ (L/kg)	1.13
$V_c$ (L/kg)	0.90
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (μg/h/ mL)	152
$CL_T$ L/kg/ h)	0.02
MRT (h)	51.75

$t_{1/2\alpha}$	: Χρόνος ημίσειας ζωής της κατανομής : Distribution half-life of the drug
$t_{1/2\beta}$	: Χρόνος ημίσειας ζωής της απομάκρυνσης : Elimination half-life of the drug
$V_{d(ss)}$	: Φαινομενικός όγκος κατανομής : Apparent volume of distribution of the drug at steady-state
$V_c$	: Φαινομενικός όγκος κεντρικού διαμερισματος : Apparent volume of the central compartment
$CL_T$	: Ολική σωματική απομάκρυνση : Total body clearance of the drug
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	: Περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου : Area under the drug concentration curve extrapolated to infinity
MRT	: Μέσος χρόνος παραμονής : Mean residence time



**Εικόνα 1.** Καμπύλες απομάκρυνσης της χλωραμφενικόλης από το μυϊκό ιστό και το πλάσμα του αίματος της τσιπούρας μετά από ενδοφλέβια χορήγηση.

**Figure 1.** Chloramphenicol elimination curves from muscle tissue and blood plasma after intravascular administration to gilthead seabream *Sparus aurata*.

κε στο μυϊκό ιστό στις 64 h μετά τη χορήγηση.

Στην Εικόνα 1 μπορούμε να παρατηρήσουμε την απομάκρυνση της CAP, τις συγκεντρώσεις οι οποίες βρέθηκαν στο πλάσμα του αίματος και στο μυϊκό ιστό, καθώς και τις τυπικές αποκλίσεις.

Οι τιμές MIC του φαρμάκου με τη χρησιμοποίηση αποσταγμένου νερού με 2% NaCl υπολογίστηκαν σε 4,78 µg/mL κατά των *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1β, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *V. alginolyticus* και του *V. fluvialis* και 0,60 µg/mL για το *V. damsela*. Η προσθήκη στο υπόστρωμα 10 mM  $Ca^{2+}$  και 55 mM  $Mg^{2+}$  έδωσε τιμές MIC 19,13 µg/mL για το *V. alginolyticus* και το *V. fluvialis*, ενώ δεν έδωσε αποτέλεσμα για τα *V. anguillarum*, *P. damsela* subsp. *Piscicida* και το *V. damsela* (Πίνακας 3).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη μας πληροφορεί για τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες της CAP στο κυριότερο είδος της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας, την τσιπούρα, και για τις τιμές MIC ενάντια των πλέον σημαντικών παθογόνων βακτηρίων, τα οποία εμπλέκονται στη δραστηριότητα αυτή. Στη βιβλιογραφία δεν αναφέρονται συγκριτικές φαρμα-

## RESULTS

The data conformed equally to a two and three-compartment model. Since the three-compartment model gave  $\alpha = \beta$ , the plasma concentration versus time curve was preferably calculated from the two-exponential equation:  $C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ , where C is the plasma concentration, t is the time,  $\alpha$  and  $\beta$  are the slopes of mono-exponential declining curves and A and B are the zero time plasma concentrations. The calculated pharmacokinetic parameters of CAP in gilthead sea bream are presented in Table 1. Following the injection, the distribution half-life ( $t_{1/2\alpha}$ ) and the elimination half-life ( $t_{1/2\beta}$ ) of CAP from plasma were found to be 1.6 and 69 h, respectively. The apparent volume of distribution of the drug at steady-state ( $V_d(ss)$ ) and the apparent volume of the central compartment ( $V_c$ ) were estimated to be 1.13 and 0.90 L/kg, respectively. The total clearance of the drug ( $CL_T$ ) was found to be 0.022 L/kg/h and the mean residence time (MRT) was 51 h. The plasma and muscle CAP levels obtained are shown in Table 2. Maximum values were observed for muscle at 2 h following injection, with levels declining in subsequent samplings. CAP became undetectable from muscle at 64 h post administration.

**Πίνακας 3.** Ελάχιστες Συγκεντρώσεις Αναστολής (MIC) ( $\mu\text{g/mL}$ ) της CAP με τη χρησιμοποίηση είτε αποσταγμένου νερού με 2% NaCl είτε με την επιπλέον προσθήκη 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  και 55 mM  $\text{Mg}^{2+}$  κατά σημαντικών παθογόνων βακτηρίων των Μεσογειακών ιχθυοκαλλιεργειών στους 22°C.

**Table 3.** Minimum inhibitory concentrations (MIC) ( $\mu\text{g/mL}$ ) of CAP using either distilled water added 2% NaCl or additionally supplemented 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 55 mM  $\text{Mg}^{2+}$  against important bacterial pathogens of Mediterranean mariculture at 22°C.

Παθογόνα βακτήρια Pathogenic bacteria	API20E Κωδ. αριθμός API20E Code number	MIC 2% NaCl	MIC + κατιόντα MIC + cations
<i>Vibrio anguillarum</i> 1b	3247524	4.78	4.78
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>Piscicida</i>	2005004	4.78	4.78
<i>Vibrio alginolyticus</i>	4247525	4.78	19.13
<i>Vibrio damsela</i>	2015004	0.60	0.60
<i>Vibrio fluvialis</i>	3247127	4.78	19.13

κοκινητικές μελέτες της CAP άλλων ειδών ψαριών. Όμως κάποιες συγκρίσεις μπορούν να γίνουν λαμβάνοντας υπόψη τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες των τριών κοινών και εγκεκριμένων σε διάφορες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης αντιβακτηριακών ουσιών, όπως της οξυτετρακυκλίνης (OTC), του οξολινικού οξέως (OA) και της φλουμεκίνης (FLU) στο ίδιο είδος ψαριού και σε παρόμοιες θερμοκρασίες του θαλασσινού νερού (Rigos et al. 2002, Rigos et al. 2003a, Rigos et al. 2003b). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της κατανομής-half-life ( $t_{1/2\alpha}$ ) της CAP (1.6 h) είναι μακρότερος σε σύγκριση με εκείνον της OTC, του OA και της FLU στην τσιπούρα (0.2 - 1.5 h) (Rigos et al. 2002, Rigos et al. 2003a, Rigos et al. 2003b), γεγονός το οποίο δείχνει ότι η CAP κατανέμεται αργά στους ιστούς της τσιπούρας από το διαμέρισμα του αίματος. Παρομοίως, οι χρόνοι ημίσειας ζωής της απομάκρυνσης ( $t_{1/2\beta}$ ) της οξυτετρακυκλίνης (OTC), του οξολινικού οξέως (OA) και της φλουμεκίνης (FLU) (12 - 50 h) (Rigos et al. 2002, Rigos et al. 2003a, Rigos et al. 2003b) είναι μικρότεροι από την αντίστοιχη τιμή της CAP (69 h) στην τσιπούρα. Σε σχέση με την απομάκρυνση, η ολική σωματική απομάκρυνση της CAP ( $\text{CL}_T$ ) (0,022 L/kg h) είναι επίσης μικρότερη σε σύγκριση προς τις τιμές οι οποίες υπολογίστηκαν στις μελέτες που προαναφέρθηκαν για τη FLU, την OTC και το OA (0,05 - 0,15 L/kg h). Ο φαινομενικός όγκος κατανομής της CAP ( $V_{d(ss)}$ ) (1,13 L/kg) είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με εκείνον της FLU (0,57 L/kg) (Rigos et al. 2003a), αλλά μικρότερος εκείνου της OTC και του OA (2,11 - 2,90 L/kg), (Rigos et al. 2002, Rigos et al. 2003b). Η τιμή  $V_{d(ss)}$  της CAP δείχνει μια ικανοποιητική διασπορά του φαρμάκου στους ιστούς, η οποία είναι ζωτικής σημασίας στην καταπολέμηση της ανάπτυξης των παθογόνων βακτηρίων τα οποία περιορίζονται σε ιστούς, οι οποίοι αιματώνονται ασθενώς.

Έχει αναφερθεί ότι η CAP εξαφανίζεται από το μυϊκό ιστό των ψαριών του γλυκού νερού πολύ πιο γρήγορα από την OTC (Anhalt, 1977). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τις συγκρίσεις καταλοίπων (OTC vs CAP), οι οποίες γίνονται στην τσιπούρα για OTC (Rigos et al. 2003b). Στην

The MIC values of the drug, using distilled water supplemented with 2% NaCl, were measured to be 4.78  $\mu\text{g/mL}$  against *Vibrio anguillarum* serotype 1b, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *V. alginolyticus* and *V. fluvialis* and 0.60  $\mu\text{g/mL}$  for *V. damsela*. The addition of 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 55 mM  $\text{Mg}^{2+}$  in the medium revealed MIC values of 19.13  $\mu\text{g/mL}$  for *V. alginolyticus* and *V. fluvialis*, whereas no effect was evident for *V. anguillarum*, *P. damsela* subsp. *Piscicida* and *V. damsela* (Table 3).

## DISCUSSION

The present study provides information on the pharmacokinetics of CAP in the leading species of Mediterranean fish farming, the gilthead sea bream and reveal MIC values against important bacterial pathogens involved in this industry. No comparable studies on the kinetic profile of CAP in other farmed fishes exist. However, some comparisons can be made by integrating the pharmacokinetics of three common and registered antibacterial agents in several European countries, including oxytetracycline (OTC), oxolinic acid (OA) and flumequine (FLU) in the same fish species and at similar water temperatures (Rigos et al. 2002, Rigos et al. 2003a, Rigos et al. 2003b).

The distribution half-life ( $t_{1/2\alpha}$ ) of CAP (1.6 h) is longer compared to the values calculated for OTC, OA and FLU in gilthead sea bream (0.2 - 1.5 h) (Rigos et al. 2002, Rigos et al. 2003a, Rigos et al. 2003b), indicating that CAP is distributed slowly to the tissues of gilthead sea bream from the blood compartment. Similarly, the elimination half-lives ( $t_{1/2\beta}$ ) of OTC, OA and FLU (12 - 50 h) (Rigos et al. 2002, Rigos et al. 2003a, Rigos et al. 2003b) are shorter than the corresponding value of CAP (69 h) in gilthead sea bream. In accordance with elimination, the total clearance of the CAP ( $\text{CL}_T$ ) (0.022 L/kg/h) is also slower compared to the values estimated in the aforementioned studies for FLU, OTC and OA (0.05 - 0.15 L/kg/h). The apparent volume of distribution of CAP at steady-state ( $V_{d(ss)}$ ) (1.13 L/kg) is higher compared to that calculated for FLU (0.57

παρούσα έρευνα η CAP δεν ανιχνεύθηκε στο μυϊκό ιστό της τσιπούρας 64 h μετά την έγχυση, ενώ στη δημοσιευμένη μελέτη, η οποία προαναφέρθηκε, η OTC ανιχνεύθηκε ακόμα και 7,5 μέρες μετά την έγχυση. Από τη στιγμή κατά την οποία τα είδη ψαριών και η θερμοκρασία του νερού είναι ιδανικές στις μελέτες αυτές, το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται σε διαφορά κατά τη διαδικασία αποτοξίνωσης ανάμεσα στη CAP και OTC, η οποία κυρίως αναφέρεται στην ομάδα ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στην πρώτη φάση (Phase I) μεταβολισμού των φαρμάκων (microsomal cytochrome P450-dependent mixed-function oxidase system), η οποία αποτελεί τον αρχικό μηχανισμό οξειδωσης στο μεταβολισμό των φαρμάκων και άλλων εξωγενών ουσιών (Stegeman, 1989). Επιπρόσθετα, η απομάκρυνση της CAP από το μυϊκό ιστό της τσιπούρας είναι ταχύτερη σε σύγκριση με εκείνη η οποία υπολογίστηκε στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Skare et al. 1974), στην οποία τα κατάλοιπα της CAP μετρήθηκαν ακόμα και 8 μέρες μετά από τη χορήγηση, όταν το φάρμακο χορηγήθηκε σε κάψουλες ζελατίνης (50 mg/kg fish). Γενικά, ο μεταβολισμός και η απομάκρυνση των φαρμάκων είναι ταχύτερος στα ψάρια του θαλασσινού νερού σε σύγκριση με εκείνα του γλυκού νερού (Ishida, 1992). Μια ταχύτατη απομάκρυνση της CAP από το μυϊκό ιστό και το πλάσμα του αίματος της καραβίδας *Penaeus monodon* και της καραβίδας *Penaeus japonicus* διαπιστώθηκε από τη μελέτη των Liu and Liu (1993), κατά την οποία το φάρμακο χορηγήθηκε per os (50 mg/kg) ή με φαρμακούμενο λουτρό 24 h (80 µg/L) και η CAP δεν ανιχνεύθηκε μετά από 24 h.

Οι τιμές MIC του φαρμάκου με τη χρήση διασπασταμένου νερού με 2% NaCl βρέθηκαν να είναι κάτω από 1 µg/ml μόνο για το *V. damsela*, ενώ οι τιμές MIC για το *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1b, το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, το *V. alginolyticus* και το *V. fluvialis* ήταν πολύ υψηλότερες (4,78 µg/ml). Η προσθήκη των θαλάσσιων κατιόντων στο υλικό είχε ως αποτέλεσμα την κατά 4 φορές μείωση της δραστηριότητας της CAP ως προς το *V. alginolyticus* και το *V. fluvialis*, ενώ δεν είχε επίδραση στο *Vibrio anguillarum*, το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και το *V. damsela*. Έτσι, η ανταγωνιστική επίδραση της αλατότητας στη δραστηριότητα της CAP φαίνεται ότι εξαρτάται από το είδος. Αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα του Torkildsen et al (2000), ο οποίος μελέτησε την επίδραση των στοιχείων του θαλασσινού νερού στη δραστηριότητα της CAP μαζί με άλλα φάρμακα κατά των βακτηρίων εκείνων τα οποία σχετίζονται με τις λάρβες των χτενιών. Εφόσον η CAP στοχεύει το βακτηριακό ριβόσωμα, οι διαφορές στη μείωση της δραστηριότητας του φαρμάκου για τα βακτήρια τα οποία ελέγχθηκαν, πιθανόν να οφείλονται στη μειωμένη διαπερατότητα του κυτταρικού περιβλήματος των βακτηρίων, τα οποία έδειξαν αυξημένες τιμές MIC λόγω της επιρροής των κατιόντων (Torkildsen et al. 2000).

Μια μάλλον θεωρητική εκτίμηση της απόδοσης ενός φαρμάκου εναντίον των βακτηριακών παθογόνων βασίζεται στη γενική αρχή κατά την οποία μετά από χορήγηση

L/kg) (Rigos et al., 2003a), but smaller to the values found for OTC and OA (2.11 – 2.90 L/kg) (Rigos et al. 2002, Rigos et al., 2003b). The  $V_{d(ss)}$  value of CAP indicates an adequate distribution of the drug into tissues which is of vital importance against pathogenic bacteria localized in poorly vascularized tissues.

It has been reported that CAP is disappeared much faster compared to OTC from the muscle of fresh water fishes (Anhalt, 1977). This is in agreement with residue comparisons (OTC vs CAP) that can be made from OTC studies in gilthead sea bream (Rigos et al., 2003b). In the present study, CAP was undetectable in gilthead sea bream muscle at 64 h post-injection, whereas OTC in the above unpublished work was measured at even 7.5 days post-injection. Since fish species and water temperature are identical between these studies, this is probably due to the differences in the detoxification process between CAP and OTC mainly directed to microsomal cytochrome P450-dependent mixed-function oxidase system, which is the primary mechanism to catalyse oxidative metabolism of a variety of drugs along with other exogenous compounds (Stegeman, 1989). Additionally, the elimination of CAP from gilthead sea bream muscle is shorter compared to that found in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Skare et al. 1974), where CAP residues were measured even after 8 days post administration, when the drug was given in gelatin capsules (50 mg/kg fish). In general, the processing and elimination of drugs is faster in marine compared to fresh water species (Ishida, 1992). A rapid CAP elimination from giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and kuruma prawn (*P. japonicus*) muscle and serum has been demonstrated in the study of Liu and Liu (1993), where the drug was administered orally (50 mg/kg prawn) or by 24 h-bath (80 µg/L) treatment and become undetectable within 24 h.

In Figure 1 we can see CAP elimination from blood plasma and muscle tissue, the mean concentrations found and the standard deviations calculated.

The MIC values of the drug, using distilled water supplemented with 2% NaCl, were found to be below 1 µg/mL only for *V. damsela*, whereas corresponding values against *Vibrio anguillarum* serotype 1b, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *V. alginolyticus* and *V. fluvialis* were much higher (4.78 µg/mL). The addition of marine cations in the medium resulted to a 4-fold reduction in CAP activity against *V. alginolyticus* and *V. fluvialis*, whereas showed no effect for *V. anguillarum*, *P. damsela* subsp. *piscicida* and *V. damsela*. Thus, the antagonistic effect of salinity on the activity of CAP is likely to be species-dependent. This agrees with findings from Torkildsen et al. (2000), who investigated the effect of seawater components to the activity of CAP along with other drugs against bacteria associated with scallop larvae. Since CAP targets the bacterial ribosome, differences on the reduction of the activity of the drug against the bacteria tested may be probably due to the decreased permeability of the cell envelope of the bacteria, which revealed increased

η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος υπερβαίνει την αναλογία 4:1 (ανώτατο επίπεδο στο πλάσμα του αίματος:MIC) (Stamm, 1989). Εντούτοις, αυτή η πρόταση έχει διαψευστεί σε σημαντικό βαθμό (Smith et al, 1994) και θα έπρεπε να χρησιμοποιείται με προσοχή. Μετά την ένεση η μέγιστη συγκέντρωση της CAP στο πλάσμα του αίματος είναι μόλις πάνω από τις τιμές MIC, οι οποίες βρέθηκαν για τα παθογόνα βακτήρια που ελέγχθηκαν, με μια εξαίρεση (το *V. damsela*) μόνο για τις πρώτες δυο ώρες. Μια χορήγηση CAP από το στόμα προφανώς θα είχε ως αποτέλεσμα σημαντικώς χαμηλότερα επίπεδα στο πλάσμα του αίματος. Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη την πρόταση του Stamm (1989), η CAP δε θα έπρεπε να θεωρείται ότι είναι αποτελεσματική τουλάχιστον για το *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1b, το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, το *V. alginolyticus* και το *V. fluvialis*. Για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση απαιτούνται περισσότερα πειράματα τυχαίας μόλυνσης (challenge) με αυτά τα παθογόνα βακτήρια ακολουθούμενα από θεραπεία με CAP.

Συμπερασματικά, η CAP παρουσιάζει ικανοποιητική φαρμακοκινητική συμπεριφορά με μια γρήγορη απομάκρυνση από το μυϊκό ιστό της τσιπούρας. Όμως, οι υψηλές τιμές MIC σε συνδυασμό με τις χαμηλές συγκεντρώσεις της στο πλάσμα του αίματος μετά από ενδοφλέβια χορήγηση προειδοποιούν για μια πιθανή μη αποτελεσματική δράση κατά των σημαντικών βακτηριακών παθογόνων της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας. Τα ευρήματα αυτά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η CAP είναι ένας απαγορευμένος παράγοντας θα πρέπει να αποκλείσει κάθε πιθανότητα αξιολόγησής της ως κάποιοι υποψήφιοι εναλλακτικοί παράγοντες, ακόμα και για πειραματικούς σκοπούς, στα εκτρεφόμενα ψάρια των θερμών νερών. □

MIC values due to the influence of the seawater cations (Torkildsen et al. 2000).

A rather theoretical assessment of a drug's efficiency against bacterial pathogens relies on the guideline, where its maximum plasma concentration following administration in the target species exceeds the factor 4:1 (peaked plasma level:MIC) (Stamm, 1989). However, this proposal has been considerably contradicted (Smith et al. 1994) and should be treated with caution. Following the injection, CAP plasma maximum concentration is just above the MIC values found for the bacterial pathogens tested with one exception (*V. damsela*) for only the first 2 h. An oral administration of CAP would obviously reveal considerably lower peaked plasma levels. Therefore, considering the proposal of Stamm (1989), CAP can not be considered as being effective at least against *Vibrio anguillarum* serotype 1b, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *V. alginolyticus* and *V. fluvialis*. Further challenge tests with these bacterial pathogens followed by CAP treatment are required to confirm this assumption.

In conclusion, CAP displayed an adequate kinetic behavior with a rapid elimination from gilthead sea bream muscle, however, its high MIC values, coupled with the low peaked CAP plasma levels after the injection, warn for a possible inefficacy against important bacterial pathogens of Mediterranean mariculture. The present findings, integrated with the fact that CAP is a banned agent, should reject the possibility for evaluating CAP as an alternative treatment candidate even for experimental purposes in warm water fish farming. □

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Anhalt G (1977) Residues of antibiotics in freshwater fish. *Neue Folge*, 55:848-854
- Baggot JD (1977) The Principles of Drug Disposition in Domestic Animals. In: The basis of Veterinary Clinical Pharmacology. W.B. Saunders Co., Philadelphia. pp. 238
- Bakopoulos V, Adams A, Richards RH (1995) Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece in comparison with strains from Japan, France and Italy. *Journal of Fish Diseases*, 18:1-7
- Barnes AC, Hastings TS, Amyes SGB (1995) Aquaculture antibacterials are antagonized by seawater cations. *Journal of Fish Diseases*, 18:463-465
- Cravedi JP, Heuillet JC, Wal JM (1985) Disposition and metabolism of chloramphenicol in trout. *Xenobiotica*, 15:115-121
- IARC 1990 International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Pharmaceutical Drugs, Vol. 50. Lyon, France, pp. 415
- Ishida N (1992) Tissue levels of oxolinic acid after oral or intravascular administration in freshwater and seawater rainbow trout. *Aquaculture*, 102:9-15
- Liu CK, Liu YF (1993) Distribution and residues of chloramphenicol in prawns. COA Fisheries Series, 48:10-16
- Lunestad BT, Samuelsen OB (2001) Effects of sea water on the activity of antimicrobial agents used in aquaculture; implications for MIC testing. *Aquaculture*, 196:319-323
- Mercedes A, Blanch AR (1994) A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 76:79-85
- MVM (1998) The Merck Veterinary Manual. S.E. Aiello and A. Mays, eds. Whitehouse Station, NJ: 1775-1779
- Pursell L, Samuelsen OB, Smith P (1995) Reduction in the in-vitro activity of flumequine against *Aeromonas salmonicida* in the presence of the concentrations of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions found in seawater. *Aquaculture*, 135:245-255
- Rigos G, Alexis M, Tyrpenou AE, Nengas I, Piper I, Troisi G (2002) Pharmacokinetics of oxolinic acid in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases*, 25:1-8.
- Rigos G, Tyrpenou AE, Nengas I, Yiagnisi M, Koutsodimou M, Alexis M, Troisi G (2003a) Evaluation of flumequine as a treatment agent in Mediterranean mariculture; pharmacokinetics in gilthead sea bream *Sparus aurata* and *in vitro* activity against important bacterial fish pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54:35-41
- Rigos G, Nengas I, Tyrpenou AE, Alexis M, Troisi G (2003b) Pharmacokinetics of oxytetracycline in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 221:75-83

- Ritschel WA (1986) Handbook of Basic Pharmacokinetics including clinical applications. 3rd ed, Drug Intelligence Publications Inc., Hamilton, pp. 544
- Robert R, Miner P, Nicolas JL (1996) Mortality control of scallop larvae in the hatchery. Aquaculture International, 4:305-313
- Skare JU, Hastein T, Froslic A (1974) Determination of residues of chloramphenicol in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). Nord Veterinary Medicine, 26:108-115
- Smith P, Hiney M, Samuelsen OB (1994) Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation on method and meaning. Annual Review of Fish Diseases, 4:273-313
- Stamm JM (1989) *In vitro* resistance by fish pathogens to aquacultural antibacterials, including the quinolones difloxacin (A-56619) and sarafloxacin (A-56620). Journal of Aquatic Animal Health, 1:135-141
- Stegeman JJ (1989) Cytochrome P-450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities. Xenobiotica, 19:1093-1110
- Torkildsen L, Samuelsen OB, Lunestad, BT, Bergh, O (2000) Minimum inhibitory concentrations of chloramphenicol, florfenicol, trimethoprim/sulfadiazine and flumequine in seawater of bacteria associated with scallops (*Pecten maximus*) larvae. Aquaculture, 185:1-12
- Tyrpenou A, Rigos G, Athanassopoulou F (2002) Determination of chloramphenicol residues in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) tissues by HPLC- PDA. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 25:655-663